

ALDOSE REDUCTASE INHIBITOR AND AGENT FOR REMOVING ACTIVE OXYGEN

Publication number: JP2002220334

Publication date: 2002-08-09

Inventor: TOMATSU MAKOTO; HORI KAZUYUKI; ISHIKAWA MASAKO;
SHIBAMOTO NORIO

Applicant: AKITA PREFECTURE

Classification:

- international: A23L1/30; A61K31/216; A61K31/7042; A61K31/7048;
A61K36/18; A61P3/08; A61P39/06; C07H17/07; C12N9/99;
C07H17/07; A23L1/30; A61K31/21; A61K31/7042; A61K36/18;
A61P3/00; A61P39/00; C07H17/00; C12N9/99; C07H17/00;
(IPC1-7): A61K35/78; C07H17/07; A61K31/216; A23L1/30;
A61K31/7048; A61P3/08; A61P39/06; C12N9/99

- european:

Application number: JP20010017975 20010126

Priority number(s): JP20010017975 20010126

Report a data error here

Abstract of JP2002220334

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an aldose reductase inhibitor and an agent for removing active oxygen which are used for conventional foods or food materials and also ensure safety and almost free from side effects and further has extracts from agricultural and marine products as an effective component. **SOLUTION:** The aldose reductase inhibitor and the agent for removing active oxygen contain, as an effective component, at least one compound selected from the group consisting of methyl chlorogenate, quercetin-3-O- xylopyranosyl glucopyranoside, kaempferol-3-O-xylopyranosyl glucopyranoside, quercetin-3-O-glucopyranoside and quercetin-3-O-(6"-acetylglucopyranoside).

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-220334
(P2002-220334A)

(43) 公開日 平成14年8月9日 (2002.8.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
A 6 1 K 31/216		A 6 1 K 31/216	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	B 4 C 0 5 7
A 6 1 K 31/7048		A 6 1 K 31/7048	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/08		A 6 1 P 3/08	4 C 0 8 8
39/06		39/06	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-17975 (P2001-17975)	(71) 出願人	591108178 秋田県 秋田県秋田市山王4丁目1番1号
(22) 出願日	平成13年1月26日 (2001.1.26)	(72) 発明者	戸松 誠 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番地26号 秋田県総合食品研究所内
		(72) 発明者	堀 一之 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番地26号 秋田県総合食品研究所内
		(74) 代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アルドースリダクターゼ阻害作用剤および活性酸素消去作用剤

(57) 【要約】

【課題】 従来より食品もしくは食品素材として利用されており、安全性に問題がなく、各種疾患に対して副作用の心配が殆どない農水産物からの抽出物を有効成分とするアルドースリダクターゼ阻害作用剤および活性酸素消去作用剤を提供すること。

【解決手段】 クロロゲン酸メチル、ケルセチン-3-O- α -キシロピラノシルグルコピラノシド、ケンフェロール-3-O- α -キシロピラノシルグルコピラノシド、ケルセチン-3-O- α -グルコピラノシドおよびケルセチン-3-O- (6''-アセチルグルコピラノシド) よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするアルドースリダクターゼ阻害作用剤並びに活性酸素消去作用剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 クロロゲン酸メチル、ケルセチン-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケンフェロール-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケルセチン-3-O-グルコピラノシドおよびケルセチン-3-O-(6''-アセチルグルコピラノシド)よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするアルドースリダクターゼ阻害作用剤。

【請求項2】 クロロゲン酸メチル、ケルセチン-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケンフェロール-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケルセチン-3-O-グルコピラノシドおよびケルセチン-3-O-(6''-アセチルグルコピラノシド)よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とする活性酸素消去作用剤。

【請求項3】 請求項1記載のアルドースリダクターゼ阻害作用剤または請求項2記載の活性酸素消去作用剤を含有してなる食品もしくは食品素材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トチュウに由来する物質を有効成分とするアルドースリダクターゼ阻害作用剤、活性酸素消去作用剤並びにこれらを含有する食品もしくは食品素材に関する。

【0002】

【従来の技術】活性酸素、フリーラジカルが種々の疾患（動脈硬化、虚血性再還流障害、白内障、リウマチ等）の病体増悪因子であることが明らかになってきている。生体内においては、スーパーオキシドディスムターゼ（以下、SODと称することがある。）が、それらを防御する作用を有しているが、多量の活性酸素が発生したときや、加齢に伴ってSODが減少した場合には、防御しきれなくなり、上記の疾患が生じると言われている。

【0003】そこで、SOD製剤やリポソーム化SOD製剤等が開発されているが、SODはタンパク質であるので、経口での体内吸収率が低く、また製剤としても安定性が悪いという問題がある。そのため、活性酸素消去作用剤の開発が求められている。

【0004】他方、糖尿病患者数は近年、急増しており、持続的な高血糖状態が様々な合併症（網膜症、腎症、神経障害等）を引き起こすことが知られている。これら合併症の発症には、ポリオール代謝経路の亢進が深く関わっているとされ、この経路の律速酵素であるアルドースリダクターゼ（以下、ARと称することがある。）の阻害作用を示す物質の探索が進められ、合成物質エパレルスタットが開発された他、種々の植物由来成分、例えば桂皮、芍薬、桑白皮、甘草、黄杞、フトモモ、ハマゴウ、ネムノキ等の抽出物が有効であるとの報告もある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来より食品もしくは食品素材として利用されており、前記したような各種疾患に対して副作用の心配が殆どない農水産物からの抽出物を有効成分とするAR阻害作用剤および活性酸素消去作用剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、トチュウ科植物の有機溶媒もしくは水による抽出物中に上記目的に適合する物質が含まれていることを究明し、本発明に到達した。

【0007】請求項1に記載の本発明は、クロロゲン酸メチル、ケルセチン-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケンフェロール-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケルセチン-3-O-グルコピラノシドおよびケルセチン-3-O-(6''-アセチルグルコピラノシド)よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするアルドースリダクターゼ阻害作用剤である。

【0008】請求項2に記載の本発明は、クロロゲン酸メチル、ケルセチン-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケンフェロール-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド、ケルセチン-3-O-グルコピラノシドおよびケルセチン-3-O-(6''-アセチルグルコピラノシド)よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とする活性酸素消去作用剤である。

【0009】請求項3に記載の本発明は、請求項1記載のアルドースリダクターゼ阻害作用剤または請求項2記載の活性酸素消去作用剤を含有してなる食品もしくは食品素材である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のアルドースリダクターゼ阻害作用剤および活性酸素消去作用剤の有効成分として用いる前記5種類の化合物は、いずれもトチュウ科植物に含まれている。トチュウ (*Eucommia ulmoides*) は、中国原産のトチュウ科トチュウ属の落葉性植物であり、中国では樹皮が漢方薬として利用されており、わが国では乾燥させた葉が茶として飲用に供されている。

【0011】トチュウ葉から抽出されたカンデリンA-2という物質が活性酸素消去作用を有していることは報告されている（特開平7-138158号公報）が、本発明において有効成分として使用する物質はカンデリンA-2とは全く別異のものである。また、トチュウに由来する物質がアルドースリダクターゼ阻害作用を有することについては、これまでに知られていない。

【0012】本発明において有効成分として用いる化合物をトチュウ科植物、例えばトチュウ葉から抽出するために使用する溶媒の例としては、メタノール、エタノール、アセトンなどの有機溶媒の他に水（熱水を含む）が

3

あり、これらを混合物として用いることもできる。

【0013】以下に、抽出条件などについて説明する。
重量比で5～15倍程度の抽出溶媒に乾燥したトチュウ葉を浸漬し、常温で可溶性成分の溶出を行うと、本発明に係る有効成分を含有する抽出液が得られる。溶媒を留去して得た抽出物は、そのまま、あるいは簡単な脱臭処理、脱色処理等を施したものを、本発明におけるアルドースリダクターゼ阻害作用剤および活性酸素消去作用剤の有効成分として使用することができる。なお、抽出物に対して、クロマトグラフィー、イオン交換樹脂処理、液-液分配抽出等の任意の精製処理を施して有効成分の含有率を高めれば、アルドースリダクターゼ阻害作用活性や活性酸素消去作用活性がより強くなり、有効成分としての利用性が向上する。

【0014】これらの抽出物等は、食品や医薬品などの形態で提供される。食品もしくは食品素材として用いる場合は、単独で各種食品に添加する他、必要に応じて安定剤、増量剤、賦形剤などの補助剤と併用して用いることができる。本発明に係る有効成分の食品等への添加量は、用途などを考慮して適宜決定すればよい。また、医薬品として用いる場合には、散剤、顆粒、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、シロップ剤などの任意の剤形を採用することができる。製剤化にあたっては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤、安定剤、矯味・矯臭剤、香料等の助剤を必要に応じて適宜混合することができる。なお、有効成分の使用量については、一般に1日あたり約5～500mgが適当である。

【0015】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例1

トチュウ乾燥葉400gを4リットルの熱水で抽出し、得られた抽出液をMCIGEL CHP20P（三菱化学（株）製）カラム（抽出溶媒：0～25%アセトン-水・グラジエント）を用いたクロマトグラフィーにより分離し、フラクション1、2、3および4を得た。各フラクションをBio-Gel P-6（Bio Rad社製）、Wakogel C-300（和光純薬（株）製）、Sephadex LH-20（Amersham Pharmacia社製）等のカラムクロマトグラフィーにより分離し、クロロゲン酸メチル 100mg、ケルセチン-3-O- 40

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - (AS - AB) / (CS - CB)] \times 100$$

【0019】ASは試料の反応後の吸光度、ABはブランクの試料の反応後の吸光度、CSは対照の反応後の吸光度、CBはブランクの対照の反応後の吸光度をそれぞれ示す。

【0020】

【表1】第1表

4

キシロピラノシルグルコピラノシド 7mg、ケンフェロール-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド 262mg、ケルセチン-3-O-グルコピラノシド 162mgおよびケルセチン-3-O-（6''-アセチルグルコピラノシド） 55mgを得た。

【0016】上記のようにして得たクロロゲン酸メチル（試料1）、ケルセチン-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド（試料2）、ケンフェロール-3-O-キシロピラノシルグルコピラノシド（試料3）、ケルセチン-3-O-グルコピラノシド（試料4）およびケルセチン-3-O-（6''-アセチルグルコピラノシド）（試料5）について、下記の方法で活性酸素消去活性を測定した。なお、比較例として、活性酸素消去活性を持つことが知られているケルセチンを用い、同様に測定した。

【0017】活性酸素消去活性の測定方法

96穴マイクロプレートにて、溶液A（65mM リン酸カリウム、35mM四ホウ酸ナトリウム、0.5mM エチレンジアミンテトラ酢酸2ナトリウム塩） 20μL、0.5mM キサンチン 20μL、1mM 塩化ヒドロキシルアンモニウム 10μLおよび水 20μLを含む溶液に、試料 10μLを加え、さらに400mM/mLのキサンチンオキシダーゼ 20μLを添加した後、37℃で30分間反応させる。反応終了後、発色液（N-1-ナフチルエチレンジアミン 1.9mg、スルファニル酸 130mgおよび氷酢酸 62.5mLを水に溶解させ、250mLとしたもの） 100μLを加えて攪拌したのち、30分以上放置してから、マイクロプレートリーダーにて波長550nmにおける吸光度を測定し、活性酸素消去活性を算出する。なお、対照として、試料の代わりに水を用い、またブランクとしてキサンチンオキシダーゼの代わりに水を加え、同様の操作を行う。得られた測定結果から、下記の計算式により阻害率を算出する。結果を第1表に示す。表から明らかなように、試料1～5はいずれも阻害活性を有し、特に試料1はケルセチンの約80%の阻害活性を示した。

【0018】

【数1】

5

試料 [*]	阻害率 (%)
1	71.8
2	19.6
3	12.2
4	25.4
5	20.6
ケルセチン	90.3

* 最終濃度 10 mM

【0021】実施例2

実施例1と同じ試料1～5について、下記の方法で生体モデル系での抗酸化試験を行った。なお、比較例として、本活性を持つことが知られている α -トコフェロールを用いた。

【0022】赤血球膜ゴースト系での抗酸化試験

ウサギ赤血球を低張処理して得た赤血球膜ゴーストをタンパク質濃度が反応液中で、1 mg/mLになるように100 mM リン酸緩衝液で調製する。この溶液に、試料を最終濃度が100 mMになるように加え、37℃で30分間反応させる。次いで、この溶液 1 mLにTB
A試薬(0.375%チオバルビツール酸、15%トリクロロ酢酸、0.04%ブチルヒドロキシトルエン、2%エタノールおよび0.25 N塩酸) 2 mLを加え、沸騰水浴上で15分間加熱し、冷却後、波長535 nmの吸光度を分光光度計で測定し、阻害率を求めた。また、対照として、試料の代わりに水を加え、同様の操作を行う。得られた測定結果から、下記の計算式により阻
害率を算出する。結果を第2表に示す。表から明らかに、試料1～5はいずれも阻害活性を有し、特に試料5は α -トコフェロールの2倍以上の抗酸化活性を示した。

【0023】

【数2】

$$\text{阻害率}(\%) = [1 - (A/C)] \times 100$$

【0024】Aは試料の反応後の吸光度、Cは対照の反

$$\text{阻害率}(\%) = [1 - (A_0 - A_1) / (C_0 - C_1)] \times 100$$

【0029】A0は酵素反応開始前の吸光度、A1は酵素反応後の吸光度、C0は対照の酵素反応開始前の吸光度、C1は対照の酵素反応後の吸光度をそれぞれ示す。

【0030】

【表3】第3表

6

応後の吸光度を示す。

【0025】

【表2】第2表

試料	阻害率 (%)
1	27.4
2	20.5
3	18.1
4	28.6
5	54.9
α -トコフェロール	23.5

【0026】実施例3

実施例1と同じ試料1～5について、下記の方法でアルドースリダクターゼ阻害活性を測定した。なお、比較例として、本活性を持つことが知られているケルセチンを用いた。

【0027】アルドースリダクターゼ阻害活性測定法

96穴マイクロプレートにて、0.2 M リン酸緩衝液(pH 6.2) 50 μ Lに、1.5 mMのNADPH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ
ン酸) 10 μ L、100 mM DL-グリセルアルデヒド 10 μ L、水10 μ Lおよび試料 10 μ Lを加え、さらに0.03 unit/mLのヒト組換え体アルドースリダクターゼ 10 μ Lを添加した後、25℃で酵素反応を行い、10分後にマイクロプレートリーダーにてNADPH減少量を波長340 nmにおける吸光度減少量から求め、阻害活性を算出した。また、対照として、試料の代わりに水を加え、同様の操作を行う。得られた測定結果から、下記の計算式により阻害率を算出する。結果を第3表に示す。表から明らかに、試料1～5はいずれも阻害活性を有し、特に試料1はケルセチンの約1.3倍の強いAR阻害活性を示した。

【0028】

【数3】

試料 [*]	阻害率 (%)
1	86.2
2	54.3
3	46.0
4	73.6
5	64.3
ケルセチン	64.0

* 最終濃度 33 μ g/mL

【0031】

7

【発明の効果】本発明によれば、従来より食品もしくは食品素材として利用されており、安全性の上で心配のないトチュウに由来する特定の化合物を有効成分として含有するアルドースリダクターゼ阻害作用剤および活性酸素消去作用剤が提供される。

【0032】このアルドースリダクターゼ阻害作用剤は、アルドースリダクターゼ阻害作用に対して優れた効果を有しており、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、神経

8

障害等の糖尿病合併症の予防、治療に有効である。また、活性酸素消去作用剤は、スーパーオキシド消去作用、過酸化脂質抑制作用に対して優れた効果を有しており、生体中の酸化的障害によって誘起される各種疾患の予防や治療に有効である。しかも、これらは不快な味や臭いがないので、飲食物、その他の食品等に添加して提供し、日常的な摂取を容易にすることが可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テマコード* (参考)

C 1 2 N 9/99

C 1 2 N 9/99

// A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

C

C 0 7 H 17/07

C 0 7 H 17/07

(72) 発明者 石川 匡子

F ターム (参考) 4B018 MD15 ME06

秋田県秋田市下新城中野字街道端西241番
地7号 秋田県立大学内

20

4C057 AA06 AA12 BB03 DD01 KK08

(72) 発明者 柴本 憲夫

4C086 AA01 AA02 EA11 MA01 MA04

秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番地26号
秋田県総合食品研究所内

NA06 NA07 ZC35 ZC37

4C088 AB12 AC05 BA09 BA31 CA14

NA06 NA07 ZC35 ZC37

4C206 AA01 AA02 DB20 DB56 MA01

MA04 NA06 NA07 ZC35 ZC37